

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520091153061

UDC _____

厦门大学

_____ 硕 士 学 位 论 文

含活基质细胞的去上皮羊膜促进角膜上皮 干细胞特性的维持和扩增

**Amniotic membrane with live stromal cells facilitates
preservation and expansion of corneal epithelial stem cells**

杨洁

指导教师姓名: 李炜 教授

专 业 名 称: 肿瘤学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩日期: 2012 年 5 月

2012 年 5 月

含活基质细胞的去上皮羊膜促进角膜上皮干细胞特性的维持和扩增

杨洁

指导教师

李炜
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为李炜教授课题(组)的研究成果,获得李炜教授课题(组)经费或实验室的资助,在厦门大学眼科研究所实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

角膜上皮干细胞存在于角膜缘基底部,严重眼表面疾病常导致角膜上皮干细胞缺乏,造成患者严重视功能障碍甚至失明。角膜上皮干细胞体外扩增和移植是目前治疗严重角膜上皮干细胞缺乏的有效方法。理想的角膜上皮干细胞体外扩增技术是在体外模拟角膜上皮干细胞所处的微环境,以保持干细胞的特性并促进干细胞的增殖。迄今已有不同技术用于体外扩增角膜上皮干细胞,包括采用不同的载体,经过不同处理的供体细胞,以及不同的培养基等。到目前为止还没有建立一个标准化的角膜上皮干细胞体外扩增技术。

目的:羊膜作为一种载体,已经广泛应用于角膜上皮干细胞的体外扩增。一般认为,在体外,它可能作为一种干细胞的替代微环境。先前的研究使用有或无上皮的冷冻保存羊膜作为载体,其中不含羊膜来源的活细胞。本研究拟探讨含活细胞的羊膜基质是否可以发挥微环境作用,以促进角膜上皮干细胞的体外扩增。

方法:新鲜羊膜组织经过 DispaseII 37℃短暂消化后刮除上皮细胞,固定于 insert 环上,一部分羊膜于-80℃反复冻融至少三次使基质细胞死亡作为对照组(D-dAM),另外一部分羊膜未作任何处理放入 SHEM 培养基中为实验组(L-dAM)。从经 DispaseII 消化过的兔角膜缘组织块上分离兔角膜缘上皮细胞片,并转移到去上皮羊膜基质上培养大约 7 天。一部分组织块在培养前行 BrdU 标记,并示踪培养 7 天,一部分培养 3 天后进行标记且不行示踪培养。收集扩增的上皮细胞以 3T3 细胞为滋养层进行克隆培养。在羊膜表面扩增的细胞分别行 K12, K14, p63, Ki67 的 whole-mount 和切片染色,以及 IV 型胶原、VII 型胶原的切片免疫荧光染色。同时,收集上皮细胞,用蛋白印迹法检测 K12, K14, p63, Ki67 的表达。在不用任何消化处理情况下,用刮刀刮取 L-dAM 和 D-dAM 上扩增的上皮片,以备移植。

结果:在 L-dAM 上培养的上皮细胞排列更紧密,形态更小且均一。L-dAM 组上皮细胞的克隆形成率明显比 D-dAM 组高。示踪 7 天的 BrdU 标记保留细胞在 L-dAM 组明显比 D-dAM 多,而不示踪的 BrdU 标记细胞 D-dAM 稍多,但两组区别没有统计学意义。免疫荧光染色及 Western blot 均显示 L-dAM 组的 p63

和 Ki67 表达明显比 D-dAM 多, K12 在 L-dAM 组主要在浅层上皮细胞表达, 基底层不表达, D-dAM 组细胞层较少, 全层表达 K12, 蛋白印迹法结果显示 D-dAM 组 K12 表达较多; K14 切片染色 D-dAM 组全层表达, L-dAM 组表达较弱, 但蛋白印迹法显示 K14 在 L-dAM 组比 D-dAM 组稍多。在 L-dAM 上培养的上皮扩增后较易分离成完整的上皮片, 可供移植, 而 D-dAM 组的上皮刮取时易分散, 不能成完整的细胞片。培养 7 天后的两组上皮都有 IV 型胶原的表达, 在培养 14 天后的 L-dAM 组上皮刮片中也有完整的表达。

结论: 含有活基质细胞的羊膜促进角膜缘干细胞体外扩增及其干细胞特性的维持。羊膜基质细胞在角膜上皮组织工程中可能发挥微环境(niche)细胞的作用。

关键词: 羊膜、角膜上皮干细胞、基质细胞、微环境

Abstract

Background: Corneal epithelial stem cells are located in the limbal basal region, so-called limbal epithelial stem cells (LESCs). Many severe ocular surface diseases can cause limbal stem cell deficiency (LSCD), which may lead to serious visual disorder or even loss. At present, the most effective solution in the treatment of LSCD is LESCs ex vivo expansion and transplantation. The ideal ex vivo expansion technique is to imitate the LESCs niche or their microenvironment in vitro, which helps maintain the stemness of LESCs and promote LESCs proliferation. Till now, numerous ex vivo expansion methods have been developed, including using different carriers or medium, or the donor LESCs after different treatment, however, there is no standardized LESCs ex vivo expansion protocol.

Objective: Amniotic membrane (AM) has been broadly used as carrier for ex vivo expansion of LESCs, whereby AM works as a surrogate niche for stem cells. Previous studies used cryopreserved AM which contains devitalized stromal and/or epithelial cells. In this study, we intend to evaluate whether the fresh denuded AM with live stromal cells can act as a niche to facilitate ex vivo expansion of LESCs.

Subjects and Methods: Epithelium of fresh AM was removed after brief Dispase II digestion. AM stromal cells remained alive, or devitalized through repeated freeze-thaw. Limbal epithelial cell sheets isolated from rabbit limbal explants by Dispase II digestion were cultured on the basement membrane side of the live AM (L-dAM) or dead AM (D-dAM) in SHEM medium for up to 7 days. Some tissues were labeled with BrdU before culturing and then traced for 7 days. While some epithelial cells were labeled with BrdU after 3 days culture. The outgrowth of the epithelial sheets, epithelial colony-forming-efficiency (CFE) on 3T3 feeder layers, and BrdU labeling with or without tracing were performed. The whole-mount and section immunofluorescence staining for cytokeratin K12 and K14, p63, Ki67, type IV collagen and BrdU were conducted. The expression of K12, K14, p63, Ki67 was

also determined by Western blot analysis. Outgrowth epithelial sheets generated from L-dAM or D-dAM were scraped by spatula without any digestion and prepared for transplantation onto the corneal surface of a limbal stem cell deficiency rabbit model.

Results: Epithelial cells on L-dAM showed more homogeneous, compact, and smaller in cell size. The CFE of cells expanded on L-dAM was significantly higher than that on D-dAM. There were more BrdU label retaining cells on L-dAM after 7 days tracing, while after 3 days culture the BrdU labeled cells did not show significant difference. Immunofluorescence staining showed higher expression of p63 and Ki67 on L-dAM compared with D-dAM, while K12 staining showed basal epithelial cells on L-dAM were all negative, and became positive in suprabasal

epithelial cells, however, there were many positive cells in the basal layer when cultured on D-dAM. Confusingly, K14 staining showed a few expression on the L-dAM but higher on D-dAM. Western blot proved that K14, P63, and Ki67 expression were higher on L-dAM than those on D-dAM, on the contrary, the expression of K12 was higher on D-dAM than that on L-dAM. The epithelial cells from both of the two groups after 7 days culture had the expression of type IV collagen. Furthermore, the epithelial cells on the L-dAM could be easily separated as an intact cell sheet, while cells on D-dAM could not generate intact cell sheet. We are currently using this cell sheet to do transplantation.

Conclusions: AM with live stromal cells facilitates ex vivo expansion and stemness preservation of limbal epithelial stem cells. AM stromal cells may act as niche cells in ex vivo corneal epithelial tissue engineering.

Key words: Amniotic membrane; limbal stem cell; stromal cells; niche;

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
目 录.....	V
TABLE OF CONTENTS	VII
第一章 前言.....	1
1.1 正常角膜和角膜上皮的组织学及生理	1
1.2 角膜上皮干细胞	2
1.3 角膜缘干细胞的 NICHE	4
1.4 角膜缘干细胞缺乏	6
1.5 LSCD 的治疗	7
1.6 羊膜作为体外扩增载体	10
1.6.1 羊膜的组织学及免疫学特性	10
1.6.2 羊膜在眼科的应用	11
1.7 实验设计与技术路线	15
第二章 材料与方法.....	17
2.1 主要仪器	17
2.2 主要试剂	18
2.3 常用溶液的配制	19
2.4 实验内容与方法	20
2.4.1 羊膜的获取	20
2.4.2 羊膜的安装	20
2.4.3 去上皮羊膜（dAM）的制作	20
2.4.4 LIVE/DEAD 细胞活性分析	20
2.4.5 实验动物及角膜缘上皮片的获取和培养	21

2.4.6 上皮细胞克隆培养及克隆形成率	21
2.4.7 BrdU 标记及荧光染色	23
2.4.8 冰冻切片的制备	24
2.4.9 免疫荧光化学染色	24
2.4.10 免疫组织化学染色	25
2.4.11 Western blotting 检测上皮细胞有关蛋白的表达量	26
2.4.12 图像采集与数据分析	28
第三章 结果	29
3.1 两组羊膜基质细胞的形态及活性分析	29
3.2 兔角膜缘上皮细胞在两种羊膜上的扩增及细胞形态	31
3.3 在 L-dAM 上扩增的兔角膜缘上皮可被刮成完整的细胞片	33
3.4 基底膜形成情况	34
3.5 扩增后的兔角膜缘上皮克隆形成的观察	35
3.6 BrdU 标记的检测	38
3.7 各种增殖标记物在两组兔角膜缘上皮细胞的表达	40
3.7.1 Ki67 在两组兔角膜缘上皮细胞的表达	40
3.7.2 p63 在两组不同羊膜上的兔角膜缘上皮细胞的表达	42
3.8 各种分化标记物在两组兔角膜缘上皮细胞的表达	43
3.8.1 K12 在两组兔角膜缘上皮细胞的表达	43
3.8.2 K14 在两组兔角膜缘上皮细胞的表达	45
第四章 讨论	47
第五章 结论	54
参考文献	55
附录	65
致谢	66

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter1 Introduction	1
1.1 The histology and physiology of the normal cornea epithelium	1
1.2 Cornea epithelial stem cells	2
1.3 The niche of limbal stem cells	4
1.4 Limbal epithelial stem cells	6
1.5 The treatment of LSCD	7
1.6 AM as the carrier of LESC ex vivo expansion	10
1.6.1 The histology and immunology of AM	10
1.6.2 AM in ophthalmology	11
1.7 Experiment design and technical route	15
Chapter 2 Materials and methods	17
2.1 Instruments	17
2.2 Reagents	18
2.3 Preparation of solutions	19
2.4 Contents and methods	20
2.4.1 The harvest of amniotic membrane	20
2.4.2 The fixation of amniotic membrane	20
2.4.3 The production of dAM	20
2.4.4 LIVE/DEAD cell viability assay	20
2.4.5 The preparation and culture of limbal epithelial cell sheet	21
2.4.6 The colone culture and CFE of the epithelial cells	21
2.4.7 BrdU labeling and immunofluorescence	23
2.4.8 The preparation of frozen section	24

2.4.9 Immunofluorescence staining·····	24
2.4.10 Immunohistochemistry·····	25
2.4.11 Western blot·····	26
2.4.12 Image acquisition and statistical analysis·····	28
Chapter 3 results ·····	29
3.1 The morphology and viability assay of L-dAM and D-dAM ·····	29
3.2 Limbal epithelial morphology on L-dAM and D-dAM ·····	30
3.3 The intat cell sheet can be harvested from L-dAM ·····	33
3.4 The formation of basement membrane ·····	34
3.5 The clone culture and CFE of limbal epithelial ·····	35
3.6 The detection of BrdU labeling ·····	38
3.7 The proliferation markers in two group epithelial cells ·····	40
3.7.1 Ki67 in two group epithelial cells·····	40
3.7.2 p63 in two group epithelial cells ·····	42
3.8 The differentiation markers in two group epithelial cells ·····	43
3.8.1 K12 in two group epithelial cells·····	43
3.8.2 K14 in two group epithelial cells·····	45
Chapter 4 Discussion ·····	47
Chapter 5 Conclusion ·····	54
References ·····	55
Appendix·····	65
Acknowledge ·····	66

第一章 前言

角膜的透明度和完整性是保证清晰视觉的重要前提。任何疾病引起角膜透明度下降都将直接影响患者视力甚至导致失明。角膜上皮位于角膜组织的最表层。正常情况下,人角膜上皮细胞每 5-7 天完全更新一次,这种更新离不开角膜上皮干细胞的不断供给,角膜上皮干细胞一般认为位于角膜缘基底细胞层中,即角膜缘的 Vogt 栅栏结构区。一旦一些严重的眼表疾病将此区破坏,将会导致角膜缘干细胞的缺乏,随之而来会出现角膜结膜化、新生血管的长入、角膜慢性炎症、上皮的持续脱落等等一系列病理改变,患者视力将遭到严重影响甚至失明。治疗的方法多种多样,但主要原则就是补充角膜缘干细胞,进行角膜缘干细胞移植。根据干细胞缺乏的多少,处理方式也不同。对于部分角膜缘干细胞缺乏,可以采用自体健眼角膜缘干细胞移植,而对于全角膜缘干细胞缺乏,目前最具临床应用前景的是角膜缘干细胞的体外扩增及移植。到现在为止,还没有形成一个标准的角膜缘干细胞体外扩增方法,有人扩增和移植时不使用载体,而有的使用载体,扩增的上皮材料来源也不同,而在这些研究中,有关羊膜作为载体的研究最多。但是关于羊膜的使用也是众说纷纭,有的使用去上皮羊膜,有的使用完整羊膜,但不管是前者还是后者,人们一般采用的都是冷冻保存羊膜,新鲜羊膜作为体外扩增载体还没有研究报道。

1.1 正常角膜和角膜上皮的组织学及生理

角膜的组织结构从外至内分别为上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层及内皮层^[1]。

角膜上皮层是一种非角化的鳞状上皮,区别于机体其他部位如皮肤的角化鳞状上皮。角膜上皮细胞共有 6-8 层,厚度 50-52 μm ,含有丰富的神经纤维,可以防止角膜水分的丧失和病原体的侵入。上皮层包含三种不同形态的细胞,表层 1-3 层细胞为鳞状上皮,中间 1-3 层翼状细胞和基底的单层柱状细胞。在共聚焦显微镜下角膜表层鳞状上皮细胞为规则五、六边形,每个细胞中央有一亮核。柱状细胞被认为是来自角膜缘干细胞的短暂扩充细胞 (transient amplifying

cells, TACs), 是角膜上皮中唯一具有分裂功能的细胞, 有丝分裂后, 子细胞即翼状细胞向终末细胞(鳞状细胞)分化, 直至从表面脱落。柱状细胞分化产生上皮基底膜, 是上皮赖以与前弹力层附着的支架。上皮细胞之间的连接构成连接复合体, 其中最重要的为封闭小带和缝隙紧密连接, 构成上皮的渗透屏障功能。

终末分化的角膜上皮细胞表达特异性的角质蛋白 K12。当采用 K12 单克隆抗体进行免疫组织化学染色时, 可见角膜上皮细胞全层表达阳性。而在角膜缘的基底层, 即干细胞所在位置染色阴性。

上皮细胞基底膜是由基底细胞分泌产生, 在胚胎时期即已形成, 但后天分泌能力很低, 但持续终生。基底膜由 IV 型胶原, VII 型胶原, 纤维联结蛋白, 层粘连蛋白(Laminin), 以及整合素(Integrin)等组成。基底细胞与基底膜连接是通过黏附复合体完成的。基底细胞在共聚焦显微镜下表现为蜂窝状。

角膜上皮是外界环境与角膜基质间的屏障, 屏障的形成是依靠上皮基底细胞向表面化生移行成为表面两层扁平细胞, 依靠细胞间的紧密连接, 形成较高的抵抗能力, 此屏障又阻止泪液向角膜基质渗透。实验证明, 在角膜上皮、基质和内皮细胞中, 上皮细胞体外培养时对 HSV-1 感染的敏感性明显低于其他两种细胞^[2], 也说明上皮细胞对于保护角膜及眼内结构免受病原体侵害是至关重要的。

1.2 角膜上皮干细胞

一般认为, 所有能自我更新的组织一定有一个干细胞池来为其提供无限度的增殖细胞。这也同样体现在角膜上皮上, 大量的研究指出这样的细胞池存在于角膜缘基底部的 Vogt 栅栏结构区^[3](见图 1), 因此被称为角膜缘上皮干细胞(limbal epithelial stem cells, LESC)。它们具有形态小, 缺乏分化标识物如 K3/12 的表达, 并且有较高核浆比等特点。另外, 这些细胞具有高增殖潜能, 表达一些干细胞标识物, 维持 DNA 持续标记(如 BrdU 的标记)^[4]。在体内, 角膜缘干细胞呈不对称分裂, 一个子代细胞保留在干细胞池中, 而另一个细胞从基底膜上分离, 向角膜方向迁移。该细胞称为短暂扩增细胞(transient amplifying cell, TAC), 具有较高的增殖潜能。TAC 经过多次分裂后变成后期有丝分裂终末分化细胞从眼表脱落下来。LESCs 被认为是“单能性”的, 即它只产生角膜系细胞^[5]。

Mann^[6]首次间接证明角膜上皮干细胞位于角膜缘, 他观察到当兔子的中央

角膜损伤时，含色素的基底细胞会从角膜缘移行到损伤的中央角膜处。几年后 Davanger 和 Evenson^[7]也观察到了同样的迁移，并提出这个位于角膜缘处的栅栏区域是 LESC 的来源^[8]。这一点同样被以下实验证明：以母兔为供体移植板层角膜到公兔受体上，发现性染色质逐渐被稀释，说明供体上皮逐渐被宿主细胞替代。另外，角膜缘的完全去除导致角膜功能的受损，新生血管化和角膜结膜化^[8]。根据干细胞具有慢循环周期的特点，将细胞暴露于含有可标记的 DNA 前体物中，DNA 标记保留的细胞可被鉴定为干细胞。用这种方法分析发现在角膜缘处的干细胞数量达到 10%^[9]。角膜缘上皮基底细胞表现得更原始，即形态小且圆，直径约 10 μm ，小于中央角膜的基底细胞（约 17 μm ）^[10]。角膜缘基底部缺乏分化标识物的表达。如 K3^[11]和 K12^[12]在中央角膜上皮全层表达，而在角膜缘上皮只有基底层表达，但是在结膜与角膜缘基底细胞连接处无表达。另外，一些分化细胞标识物 connexin 43^[13-14]和 involucrin^[14]在角膜缘基底部也不会表达。有趣的是，祖细胞的标识物如转录因子 p63 却在角膜缘基底部表达，特别是 $\Delta\text{Np}63\alpha$ 亚型^[15]，ATP 结合盒转运体 Bcrp1/ABCG2 和 N-cadherin^[16]都在角膜缘基底部有表达。体内体外研究都发现角膜缘基底部细胞对比周边和中央角膜，有更强的增殖潜能。兔角膜周边部大部分上皮缺损却比中央区小部分缺损修复得更快，说明周边部角膜的增殖能力大于中央角膜^[17]。在人的角膜缘组织块培养中，也发现其增殖能力强于中央角膜组织块^[18]。基于人皮肤的研究^[19]，有发现从角膜缘来源的细胞产生更多的 holoclone（干细胞来源的），而中央角膜来源的细胞只形成很少的 meroclones 和 paraclones^[20]。1983 年 Thoft 提出了维持角膜上皮动态平衡的“XYZ”理论，角膜上皮的丢失（Z）由基底细胞的分裂（X）和周边上皮向中央移行（Y）共同补充，而周边上皮的基底部可能含有角膜缘干细胞^[21]。

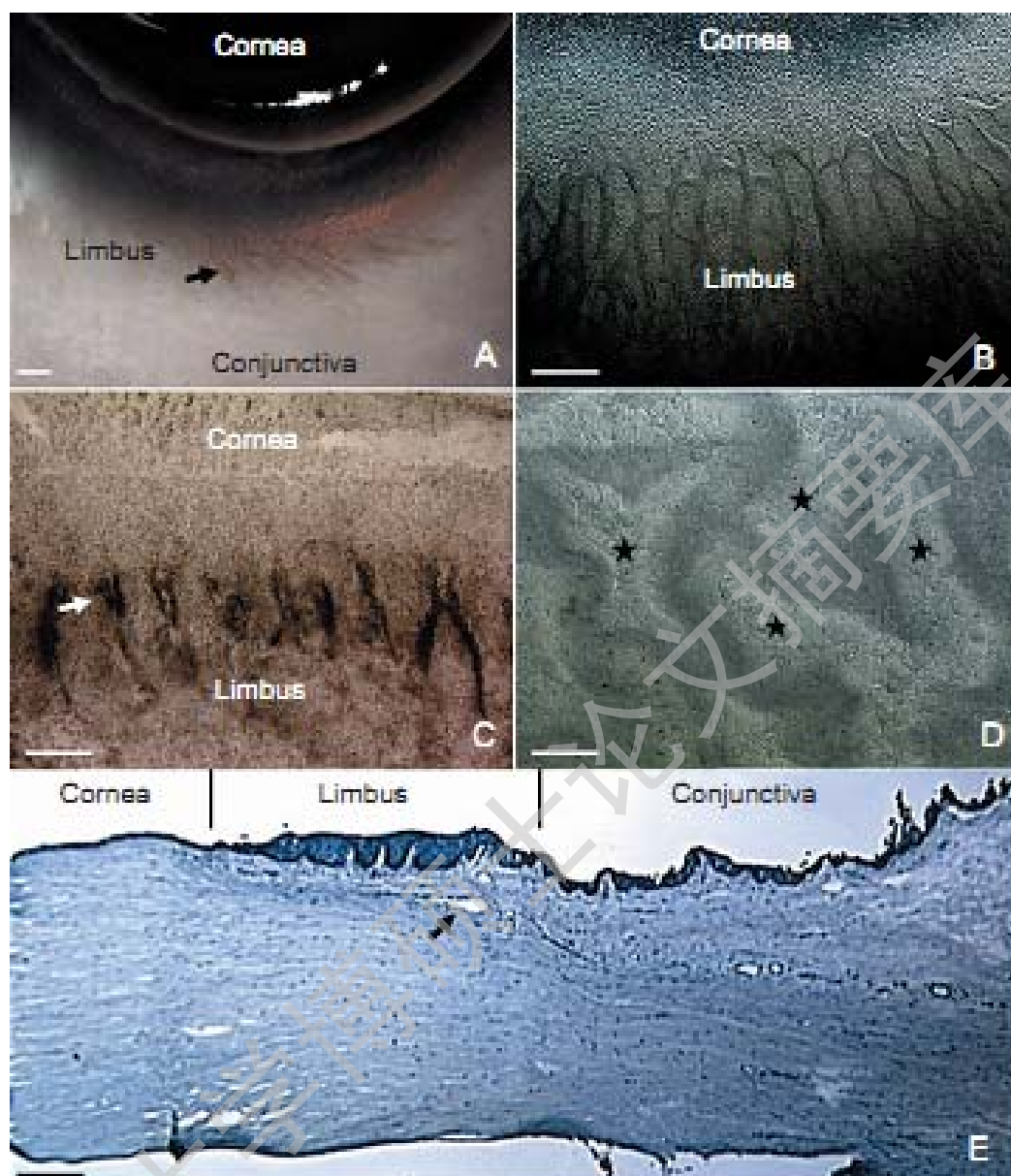


图 1. 角膜缘 Vogt 栅栏区

1.3 角膜缘干细胞的 niche

越来越多的研究^[22-24]认为人体细胞干细胞是受它们的 niche 调节, niche 即一种特殊的微环境, 包括附近的细胞或细胞间质成分, 所以在研究角膜缘干细胞的体外扩增和生物调节不能不考虑其周围 niche 的影响。Li 等^[3]在 2007 年对角膜缘干细胞的 niche 调节作了全面的综述 (见图 2), 说明 niche 调节对角膜缘干细胞的增殖分化起着很重要的作用。

一个干细胞的周围微环境或 niche, 它可以阻止干细胞分化并决定它的命运。一旦一个干细胞不对称分裂, 离开了它的 niche, 在不同的环境刺激影响下将进

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库